

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平2-288899

⑬ Int. Cl.³
C 07 K 15/12
// A 61 K 37/02

識別記号 庁内整理番号
ACS 8619-4H
8615-4C

⑭ 公開 平成2年(1990)11月28日

審査請求 未請求 請求項の数 4 (全18頁)

⑮ 発明の名称 成熟肝実質細胞増殖因子(I)

⑯ 特 願 平1-320548

⑰ 出 願 平1(1989)12月12日

優先権主張 ⑱ 昭63(1988)12月12日 ⑲ 日本(JP) ⑳ 特願 昭63-311866

㉑ 発 明 者 中 村 敏 一 福岡県福岡市東区みどりヶ丘3丁目11-6

㉒ 出 願 人 東洋紡績株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

㉓ 代 理 人 弁理士 平木 祐輔 外1名

明 細 書

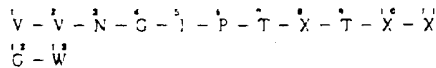
1. 発明の名称

成熟肝実質細胞増殖因子(I)

2. 特許請求の範囲

1. 二種のサブユニットからなり、かつ、下記の理化学的性質を有するポリペプチドからなる成熟肝実質細胞増殖因子(I)。

(i) β 鎖のN末端アミノ酸配列



(式中、Vはバリン、Nはアスパラギン、Gはグリシン、Iはイソロイシン、Pはプロリン、Tはトレオニン、Wはトリプトファン、Xは任意のアミノ酸を示す。)

(ii) 還元下SDS-PAGEによる推定分子量

α 鎖 60,000 \pm 3,000

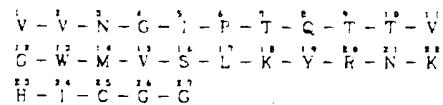
β 鎖 32,000 \pm 3,000

2. ポリペプチドが下記の理化学的性質を有する請求項1記載のラット血小板由来の成熟肝実質細胞増殖因子(I)。

(i) 次表のアミノ酸組成(モル比 \pm 10%)

アミノ酸	α 鎖	β 鎖
Cys	36.5	8.9
Asp	81.4	23.1
Thr	34.3	13.0
Ser	34.9	18.2
Glu	56.8	23.2
Gly	46.2	41.1
Ala	15.3	19.3
Val	16.8	15.1
Met	8.9	3.9
Ile	17.6	15.2
Leu	19.8	29.5
Tyr	23.3	13.0
Phe	18.0	4.0
Lys	48.6	24.0
His	17.9	9.8
Arg	33.7	17.8

(ii) N末端アミノ酸配列



(式中、Vはバリン、Nはアスパラギン、Gはグリシン、Iはイソロイシン、Pはプロリン、Tはトレオニン、Qはグルタミン、Wはトリプ

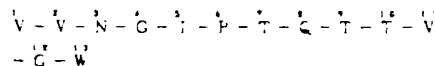
トファン、Mはメチオニン、Sはセリン、Lはロイシン、Kはリジン、Yはチロシン、Rはアルギニン、Hはヒスチジン、Qはシスチニンを示す。)

(ii)還元下SDS-PAGEによる推定分子量

α 鎖	60,000±3,000
β 鎖	32,000±3,000

3. ポリペプチドが下記の理化学的性質を有する請求項1記載のラット肝細胞由来の成熟肝実質細胞増殖因子(1)。

(i) β鎖のN末端アミノ酸配列



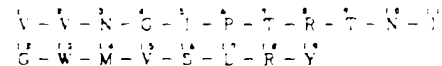
(式中、Vはバリン、Nはアスパラギン、Gはグリシン、Iはイソロイシン、Pはプロリン、Tはトレオニン、Qはグルタミン、Wはトリプトファンを示す。)

(ii)還元下SDS-PAGEによる推定分子量

α 鎖	60,000±3,000
β 鎖	32,000±3,000

4. ポリペプチドが下記の理化学的性質を有する請求項1記載のヒマ腫瘍由来の成熟肝実質細胞増殖因子(1)。

(i) β鎖のN末端アミノ酸配列



(式中、Vはバリン、Nはアスパラギン、Gはグリシン、Iはイソロイシン、Pはプロリン、Tはトレオニン、Rはアルギニン、Wはトリプトファン、Mはメチオニン、Sはセリン、Lはロイシン、Yはチロシンを示す。)

(ii)還元下SDS-PAGEによる推定分子量

α 鎖	60,000±3,000
β 鎖	32,000±3,000

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は成熟肝実質細胞増殖因子(hepatocyte growth factor: HGF)、詳しくは成熟肝実質細胞を生体外(in vitro)で培養でき、これにより該細胞の維持、増殖を可能とする新しい生理活性

を有するタンパク質に関するものである。本発明の成熟肝実質細胞増殖因子は肝再生促進薬、抗慢性肝炎薬、肝硬変への移行防止薬としての使用ができる。

(従来の技術)

肝臓は多種多様な機能を有し、生体の恒常性維持に欠くべからざる重要な役割を果たしている。肝臓の主な機能として血漿タンパク質の合成分泌、糖新生やグリコーゲン代謝による血糖調節、尿素合成、胆汁分泌、解毒などがある。また該肝臓の機能は、肝臓を構成する該実質細胞が夫々担っていることが知られている。しかるに生体内(in vivo)において、肝臓は各種のホルモンをはじめとする極めて複雑な環境下におかれており、これを構成する上記成熟肝実質細胞の機能などの研究は真に困難である。従って本発明者は、上記成熟肝実質細胞を、生体内と同等の機能を維持した状態で、単純な生体外の系で再現することができれば、上記した肝機能の研究、あるいは種々のホルモン類薬物などの成熟肝実質細胞に対する作用等

の研究に極めて有用であるとの観点から、上記成熟肝実質細胞を安定に継代培養できる体外培養系の確立を目的として鋭意研究を重ねてきた。成熟肝実質細胞は、各種の株細胞が活発に増殖する哺乳動物血清の存在下でも全く増殖が認められず、通常約1週間で脱落が起り、その生体外での長期培養が不可能であった。本発明者は、血清に含まれる特定のタンパク質成分の存在下において、成熟肝実質細胞が極めて良好に増殖し、継代培養を行いうることを見出し、該特定の血清成分の分離に成功した(Biochem. Biophys. Res. Commun., 122 (No.3), 1450~1455, 1984)。更に本発明者は、哺乳動物の血小板のトロンビン刺激上清液より特定のタンパク質性の成熟肝実質細胞増殖因子(HGF)を単離することに成功し、これが生体外において成熟肝実質細胞増殖活性を有することを見出し、この知見を先に公表した(FEBS LETTER, 224 (No.2), 311~316, 1987)。

(発明が解決しようとする課題)

本発明者は、引き続き鋭意研究を重ねた結果、

哺乳動物の血小板や白血球などの血球細胞や肝臓、腎臓、脾臓、胎盤、脳、膵臓などの生体組織ホモジオート中にも、成熟肝細胞を生体外に於いて極めて良好に増殖される活性を有する物質が存在することを見出した。該物質を精製、単離すべく種々検討を行ったところ、上記生体組織中に含まれる成熟肝細胞増殖因子(HGFと略す)にはα鎖とβ鎖とを名付けた2種のサブユニットからなる2本鎖型成熟肝細胞増殖因子(HGF(I)と略す)と1本鎖型成熟肝細胞増殖因子(HGF(II)と略す)の2種類が存在することを見出した。これら2種のHGFを分離し、それぞれの生化学的及び化学的物性を明らかにすることが期待された。

〔課題を解決するための手段〕

すなわち本発明は、成熟肝実質細胞を生体外で増殖させる活性を有する熱及び酸処理に不安定なタンパク質で、2種のサブユニットからなり、かつ、下記の理化学的性質を有するポリペプチドからなるHGF(I)に係る。

(1) β鎖のN末端アミノ酸配列

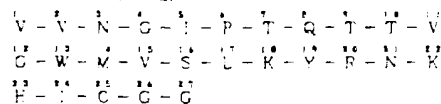
7

(1) 次表のアミノ酸組成(モル比±10%)

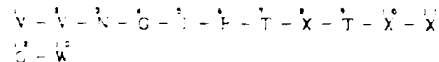
アミノ酸	α 鎖	β 鎖
Cys	36.5	8.9
Asp	21.4	23.1
Thr	34.3	13.0
Ser	34.5	18.2
Glu	56.8	23.2
Gly	46.2	41.1
Ala	15.3	19.3
Val	16.8	15.7
Met	8.9	3.9
Ile	17.6	15.2
Leu	19.8	29.5
Tyr	23.3	13.0
Phe	16.0	4.0
Lys	48.6	24.0
His	17.9	9.8
Arg	33.7	17.8

(ii) N末端アミノ酸配列

β-鎖



(式中、Vはバリン、Nはアスパラギン、Gはグリシン、Iはイソロイシン、Pはプロリン、Tはトレオニン、Qはグルタミン、Wはトリプトファン、Mはメチオニン、Sはセリン、Lは



〔式中、Vはバリン、Nはアスパラギン、Gはグリシン、Iはイソロイシン、Pはプロリン、Tはトレオニン、Qはグルタミン、Wはトリプトファン、Xは任意のアミノ酸を示す。〕

(1)還元下SDS-PAGEによる推定分子量

α 鎖 60,000±3,000

β 鎖 32,000±3,000

そして、具体的なHGF(I)として、下記の理化学的性質を有するラット血小板由来のHGF(I)

(本頁以下余白)

8

ロイシン、Kはリジン、Yはチロシン、Rはアルギニン、Hはヒスチジン、Cはシステインを示す。)

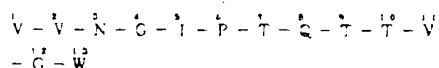
(ii)還元下SDS-PAGEによる推定分子量

α 鎖 60,000±3,000

β 鎖 32,000±3,000

下記の理化学的性質を有するラット肝細胞由来のHGF(I)、

(1) β鎖のN末端アミノ酸配列



(式中、Vはバリン、Nはアスパラギン、Gはグリシン、Iはイソロイシン、Pはプロリン、Tはトリオニン、Qはグルタミン、Wはトリプトファンを示す。)

(ii)還元下SDS-PAGEによる推定分子量

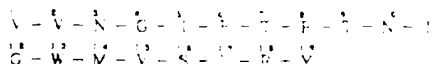
α 鎖 60,000±3,000

β 鎖 32,000±3,000

及び下記の理化学的性質を有するヒト肝臓由来のHGF(I)

9

(1) 6 鎖の N 末端アミノ酸配列



(式中、V はバリン、N はアスパラギン、G はグリシン、I はイソロイシン、L はロイシン、E はトレオニン、R はアルギニン、W はトリプトファン、M はメチオニン、S はセリン、L はロイシン、Y はチロニンを示す。)

(2) 還元下 S D S - P A G E による推定分子量

α 鎖 50,000 ± 3,000

β 鎖 32,000 ± 3,000

が挙げられる。

H G F の従来の精製方法は、血小板のトロンビン刺激上清液を出発物質として、陽イオン交換クロマトグラフィー→ヘパリンアフィニティークロマトグラフィー→逆相クロマトグラフィー系列での精製によるものであった。FEBS LETTER, 224 (No. 2), 311~316, 1987 参照のこと。

上記方法により得た H G F は S D S - P A G E (S D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動) で

約 80KD の位置に単一のバンドとして移動し、還元 S D S - P A G E でも約 59KD と約 34KD の 2 本のバンドとして移動することにより、2 種のサブユニットよりなる物質と考えられてきた。本発明者は、血小板のホモジネートを緩安塩析後、陽イオン交換クロマトグラフィー、ヘパリンアフィニティークロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーで精製することによりあらたに H G F を得た。本発明者は該方法で得た H G F が S D S - P A G E で約 80KD の位置に単一のバンドとして移動し、還元 S D S - P A G E では約 90KD と及び約 60KD、約 32KD の 3 本のバンドとして移動することを確認した。すなわち該 H G F は分子量約 8 万の 2 本鎖 H G F (H G F (I)) と 1 本鎖 H G F (H G F (II)) の 2 成分よりなることをあらたに見出したのである。

本発明者は更に、該 H G F を還元アルキル化して逆相 C₁₈ HPLC にかける電気泳動的に均一な H G F (I) の 2 種のサブユニット (分子量約 60KD の α 鎖ペプチドと分子量約 32KD の β 鎖ペプチド) 百分を

1 1

1 2

得 (第 1 図)、β 鎖の N 末端アミノ酸配列を決定、そのエイコサペプチド合成物に対する抗体カラムを精製手段として用いることにより H G F (I) を単離した。本発明は、初めて均質な H G F (I) をあたえるものである。本発明者は、H G F (I) β 鎖 N 末端 20 位のペプチドを合成、そのポリクローナル抗体、更には抗体カラムを作成した。本発明者は、血小板のホモジネートを緩安塩析後カチオン交換クロマトグラフィー、次いで上述の抗体アフィニティークロマトグラフィーにかけ、均質な H G F (I) を調製することに成功した。更に本発明者は、H G F の臓器分布を検索したところ、白血球などの血球細胞や肝臓、肺臓、腎臓、脾臓、脳、胎盤など広く生体組織に H G F が含まれていることを見出した。これらの生体組織のホモジネートからイオン交換クロマトグラフィー、色素アフィニティークロマトグラフィー、レクチンアフィニティークロマトグラフィー、ヘパリンアフィニティークロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーなどを組合わせた方法で精製し、S D S -

P A G E で約 80KD の単一バンドを示す H G F を得た。この H G F は還元条件下の S D S - P A G E で、血小板ホモジネートから精製した場合と同様、約 90KD、約 60KD と約 32KD の 3 本のバンドとして移動した。即ち、血小板をはじめとする種々の生体組織ホモジネートに由来する H G F は 2 本鎖型 H G F (I) と 1 本鎖型 H G F (II) の 2 成分よりなることを見出したのである。

本発明者は H G F (I) をより簡便に単離する方法を更に検討したところ、疎水性クロマトグラフィーの一種であるフェニル 5PW 高速液体クロマトグラフィーにより、均質な H G F (I) を得ることに成功し、本発明を完成させるに至った。

本発明の H G F (I) は、外科手術による部分肝摘出後の肝再生促進薬ならびに急性肝炎、慢性肝炎、肝硬変への移行、劇症肝炎などの肝疾患の治療薬として、また上記各疾患の診断薬として有用である。更に該 H G F (I) の利用により、ヒトをはじめとして各種動物由来の成熟肝実質細胞を、該 H G F (I) 存在下に生体外で極めて容易に増殖、

1 3

1 4

維持することが出来る。かくして増殖維持される成熟肝実質細胞は、例えば肝機能などの基礎的研究用に、また、各種ホルモン若しくは薬剤等の成熟肝実質細胞に対する作用の研究用に、肝疾患などのスクリーニング試験用に、更に発症試験用及び肝炎ウイルスの生体外培養における宿主細胞としても極めて有用である。本発明は、かかる有用な生理活性物質を提供するものである。

以下、本発明のHGF(1)の製造方法につき詳述する。本発明HGF(1)は、例えば哺乳動物の血小板等の生体組織より効率よく、しかも高収率で単離することが出来る。ここで原料として用いられる哺乳動物の血小板等の生体組織としては、特に限定はなく、例えばヒト、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ウサギ、マウス、ラットなどに由来する血小板等の生体組織のいずれをも使用することができる。これらの血小板等の生体組織は、その起源とする哺乳動物より、常法に従い分離される。

本発明HGF(1)は、上記により分離された血小板等の生体組織のホモジネートを精製すること

により単離される。HGF(1)の精製は、諸出のHGF(1)の物理的、化学的、免疫学的性質を利用した各種分離手段の組み合わせにより実施することができる。特に好ましい精製手段の一例としては、塩析法及びイオン交換クロマトグラフィー、抗体アフィニティークロマトグラフィー、色素アフィニティークロマトグラフィー、レクチンアフィニティークロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、ヘパリンアフィニティークロマトグラフィーを組み合わせる方法を例示できる。塩析には硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウムなどの塩を使用することができる。また該イオン交換クロマトグラフィーに用いられる担体としては、タンパク質分離のために用いられている通常の各種イオン交換クロマトグラフィー用の担体を、いずれも用いることができる。その具体例としては、CM-セルロース、CM-セファデックス、P-セルロース、CM-トヨパール、SP-トヨパール、モノS、S-セファロース、DEAE-セファロース、DE

15

16

AE-セファデックス、Q-セファロース等のイオン交換樹脂を例示できる。抗体アフィニティークロマトグラフィーに用いられる担体としては、例えばアフィゲル、トヨパール、セファロースなどの各種の不溶性担体に、抗体を共有結合により不溶化させた担体であれば、いずれも使用できる。

上記精製手段により精製された本発明のHGF(1)は、通常のタンパク質の純度検定手段、例えばSDS-PAGE、逆相高速液体クロマトグラフィーなどにより、均一な単品であることが確認される。

〔実施例〕

以下に参考例及び実施例を示し、本発明をより具体的に述べるが、本発明はこれに限定されるものではない。

参考例1

(HGF活性の測定その1) : Nakamura, T., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 7229-7233 (1983).

ウィスター系雄ラット(180~200g)を用い、in situ コラーゲン染色法 (Tanaka, K., *et al.*, J.

Biochem. (TOKYO) 84, 937~946(1978), 中村敏一, 初代培養肝細胞実験法, 学会出版センター pp 5~53(1987)) により肝実質細胞を分離、精製した。この肝実質細胞を5%牛血清及び 10^{-8} M インスリンを添加したウィリアムスE培地(フロー・ラボラトリー社製)に懸濁させ、ウェルマルチプレート(リンゴロン社製)に 3.6×10^4 個/ウエルの低濃度でまき込み、5%炭酸ガス及び30%酸素ガスの存在下で培養した。培養4時間後、培地を 10^{-8} M デキサメサゾンを含む無血清ウィリアムスE培地に交換した。20時間後、さらに同一培地交換及び所定量の被験試料(本発明HGF(1)又は他の各種増殖因子)の添加を行った。12時間後、 3 H-チミジンの $2.5 \mu\text{Ci}/\text{ml}$ ($54.2 \text{Ci}/\text{mmol}$) を添加し、さらに24時間培養した。尚上記 3 H-チミジンによるラベルの15分前、アフィディコジンの $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ を添加した群をコントロール群とした。上記24時間の培養によるラベル後、細胞をPBSで洗い、冷10%トリクロル酢酸(TCA)水溶液で固定した。細胞を1ウエル当り0.5mlの1N-水酸化ナ

17

18

トリウム水溶液で可溶化し、一部をとってタンパク質をローリー法に従って測定した。残液に TCA を20%になるように添加し、TCA不溶性画分を遠心沈殿により集め、5% TCA水溶液で洗浄後、10% TCA水溶液(1 ml)を加え、90℃で15分間煮沸し、上清画分の放射能をトリウム-ニタノール系シンチレーターにより測定した。被験試料により成熟肝実質細胞に取り込まれた ^3H -チミジン量を、コントロールとのカウントの差として求め、これを成熟肝実質細胞1mgタンパク質当りに換算して、DNA合成活性(dpm/mg タンパク)とし、これを被験試料のHGF活性の指標とした。尚、HGF活性を単位(U)で示す場合は、同一試験においてEGF 20ng/mlを用いた場合のDNA合成活性(EGFは該用量で最大活性を示す)の50%に相当する活性を1単位として定義する。

参考例2

(HGF活性の測定その2)

HGF活性は、また、Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 80, 7229 (1983)に記載の方法に順じて次のよう

に測定した。ウイスター系ラットからコラーゲン選抜法によって肝実質細胞を分離精製した。得られたラット肝実質細胞を5%リン血清、 2×10^5 インスリンおよび 2×10^{-10} デキサメサゾンを加えたウイリアムスE培地(フローラホトリ社)に懸濁し、24ウェルマルチプレートに 1.25×10^5 個/ウェルの密度で播いた。5% CO₂および30% O₂および65% N₂の存在下、37℃で20時間培養後、0.1 μg/mlのアプロチニンを添加したウイリアムスE培地に交換すると同時に所定量の被験試料を添加した。15時間後、 $15 \mu\text{Ci}/\text{ml}$ の ^3H -デオキシウリジン($10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ウェルを添加した。コントロール群には、 ^3H -デオキシウリジン添加の15分前に $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアフィディコリンを添加した。さらに6時間培養した ^3H でラベルした。細胞をpH 7.4のPBSで2回洗浄後、冷10%トリクロロ酢酸水溶液(TCA)で固定した。細胞を1ウェル当たり0.5 mlの1N水酸化ナトリウム水溶液で可溶化し、その放射能をガンマカウンタにより測定した。また放射能測定後の

19

20

試料の一部をとってローリー法(J. Biol. Chem., 193, 265, 1951)に従い蛋白質量を測定した。被験試料を添加したとき肝実質細胞に取り込まれた ^3H の量をコントロールとのカウントの差として求め、これをラット肝実質細胞蛋白質1mg当りに換算して、DNA合成活性(cpm/mg蛋白質)とした。被験試料のHGF活性は、同一試験において上皮細胞成長因子(EGF) 10ng/mlを用いた時の肝実質細胞のDNA合成活性の50%に相当する活性を1単位と定義して表示した。

参考例3

(抗HGF(1)抗体カラム作成法)

B鎖N末端20個、即ちV-V-N-G-I-P-T-Q-T-T-V-G-W-M-V-S-L-K-Y-Rよりなる合成ペプチド(HGF(1)-L20)は、ペプチド合成装置(AB社430A型)を用いて、フェニルアセトアジドメチル(PAM)リンカーを有するレジン(AB社製)上で合成した。固相からの合成ペプチドの切断は、トリフルオロメタンスルホン酸(TFMS)法により行い、得

られた粗合成ペプチドを、逆相高速液体クロマトグラフィーにより精製した。次に水溶性カルボジイミドを用いたY. IKEDAらの方法(Biochem. Biophys. Res. Commun., 107, 656-662(1982))に従い、該HGF(1)-L20とキークホルリンベットヘモニン(KLH)を結合させ、HGF(1)-L20-KLHを抗原として、常法に従いウサギ皮下に100 μg/宛2週間おきに3回免疫した。3回投与2週間後に全採血し、抗血清を得て、該抗血清をプロテインA-セファロースカラムに負荷し、0.1M グリシン塩酸緩衝液 pH 2.0 で溶出される画分を、IgG画分として精製した。続いて、このIgG画分をKLH-セファロースカラムにかけ、抗KLH抗体を吸着し、抗HGF(1)-L20抗体を得た。常法に従い、ブロムシアン(CNBr)活性セファロース CL-4B樹脂(ファルマン社製)に抗HGF(1)-L20抗体を結合させ、抗HGF(1)抗体カラムを作成した。

実施例1

① 血小板抽出液の調整

1200匹のラット(200~400g)から採取した血液

21

22

を遠心分離(2500g×15分)して血漿析出液を得た。血漿析出液を500mlの0.5M PMSFを含むPBS(リン酸緩衝生理食塩水、pH7.0)に懸濁させ、ポリトロンホモジナイザー(ダイアル7)で5分間ホモジナイズした。ホモジナートは24,000×gで30分間の遠心分離を行い、上清を得た。

本上清液のHGF活性(参考例1の方法で測定した)は100μg/mlの添加量で 2.4×10^4 dpm/ng肝細胞タンパクであった。全活性は136,000ユニット、比活性は33.3u/mgタンパク量であった。

② 上記①で得た上清液に硫酸アンモニウムを80%飽和になるように添加して、4℃で一晩放置後、24,000×g、30分間の遠心分離を行い沈査を得た。沈査を緩衝液A[50mM Tris-HCl(pH 8.5), 0.15M NaCl, 10mM Hepes, 2mM CaCl₂] 300mlに溶解させ、同一緩衝液で一晩透析した。透析後24,000×g、30分間の遠心分離を行い、不溶物を除去し、上清を得た。

③ 得られた遠心上清を緩衝液Aで充分平衡化したS-sepharose Fast Flowカラム(2.6×30cm

フアルマンア製)に35ml/hの流速でかけた。緩衝液Aでカラムをよく洗浄し、A_{0.15M}から1M NaClの直線濃度勾配でHGF(1)を溶出した。溶出のさいの流速は35ml/hで1フラクションBのサイズで集めた。その結果を第2図に示す。区において縦軸(1)は280nmにおける吸光度(A₂₈₀)を(2)はHGF(1)活性(参考例1の方法で測定した)を、また(3)はNaCl濃度を各々示し、横軸はフラクションNoを示す。該図よりHGFは約0.68MのNaCl濃度(フラクションNo.34~40)に溶出された。

④ 上記のフラクションNo.34~40の画分を50mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.0)にて3倍希釈し、0.15M NaClを含む10mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.4)で平衡化した抗HGF(1)-L20抗体セファロースCL-4Bカラム(ヘッドボリューム1ml)に負荷、0.5M NaCl含有10mM グリシン塩酸緩衝液(pH 4.0)で洗浄後8M尿素を含む10mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.4)で溶出を行った。結果を第3図に示す。区において、縦軸(1)は280nmにおける吸光度

2 3

(A₂₈₀)を、(2)はHGF(1)活性(参考例1の方法で測定した)、横軸はフラクションNoを示す。該図よりフラクションNo.8~12にHGF(1)を得た。

⑤ 上記②~④の精製工程の結果を下記第1表に示す。

第1表

精製工程	①で得たHGF	②で得たHGF	④で得たHGF
タンパク量(mg)	4.080	17.3	0.08
純HGF活性(U)	136,000	32,950	24,100
比活性(U/mgタンパク)	33.3	1,904	301,500
精製度(%)	1	57	9,054
回収率(%)	100	25	18

⑥ また上記④の工程で得られたHGF(1)の肝実質細胞増殖に与える効果(HGF(1)活性)の用量依存効果を下記第2表に示す。

(本頁以下余白)

2 5

2 4

第2表

試験資料	添加量	DNA合成活性 (dpm/mg 細胞タンパク)
無添加	—	0.7×10^4
④で得たHGF	2.5ng/ml	3.8×10^4
	5.0ng/ml	5.9×10^4
	10.0ng/ml	8.0×10^4

⑦ SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)

12.5%アクリルアミドを用い、ラメリらの方法(Lammeli et al., Nature., 277, 680~685(1970))に従って、上記④で得たHGFのSDS-PAGEを行った。泳動後、ゲルを40%メタノール10%酢酸で90分間固定し、10%エタノール-5%酢酸で洗浄後、銀染色を行った。HGF(1)は、単一のバンドとして染色され、その相対移動度より約80KDの分子量を有すると推定された。また還元SDS-PAGEは試料に2メルカプトエタノール(2ME)を5%加えて、非還元SDS-PAGEと同様の方法にて実施した。非還元で約80KDの分子量を有するHGF(1)は、2本のバンドとして検

2 6

出され、それらの相対移動度より、それぞれの分子量は、約50kD(α鎖)と約32kD(β鎖)であることが推定された(第4区)。

④ アミノ酸分析およびN末端アミノ酸配列の決定

上記③で得たHGF(1)画分にソウエン20及び塩化ナトリウムを、濃縮最終濃度でそれぞれ0.17及び0.27となるように加えて、遠心濃縮器(トミー精工社製)にて濃縮した。濃縮HGFを、A. Jahnssonらの方法(BERC, 104, 56(1982))を一部変更して、還元アルキル化した。すなわちHGFを4M-グアニジン塩酸を含む0.5M トリス塩酸緩衝液pH 8.6で60℃、30分処理した後、最終濃度20mMとなるようにジチオスレイトールを加えて窒素置換して、暗所室温で2時間還元反応を行った。ついで最終濃度40mMとなるようにロードアセトニドを加えて窒素置換した後、暗所室温で1時間アルキル化反応を行った。得られた還元アルキル化HGF(1)はHi-Fore 304(Bio-Rad 社製、Co.)カラムを用いた逆相高速液体クロマトグラフィー

で分離した。溶出は、30mM NaCl、及び0.1% TFA存在下にてアセトニド濃度を40%から50%迄直線的に上昇させて行った。第5区に、得られた溶出パターンを示す。図において、縦軸は280nmにおける吸光度(A₂₈₀)、横軸はアセトニド濃度を、横軸はフラクションNo.を示す。区に示す如く、アルキル化HGF(1)はピークIとピークIIに分離され、⑤項のSDS-PAGE法により、ピークIは分子量約50kDのα鎖、ピークIIは分子量約32kDのβ鎖であることを確認した。上記のHGF(1) α鎖画分およびHGF(1) β鎖画分を6M HClで110℃、24時間加水分解後、アミノ酸自動分析装置(日立製 E35型)を用いてアミノ酸分析を行った。その結果は前記した通りである。上記方法で得られたHGF(1) β鎖画分 300pmoleをペプチドシーケンサー(アプライドバイオシステム社 477A 型)を用いて30サイクル解析して、HGF(1) β鎖のN末端側アミノ酸配列を決定した。β鎖N末端側27個のアミノ酸配列は、V-V-N-G-I-P-T-Q-T-T-V-G-W

2 7

2 8

-M-V-S-L-K-Y-R-N-K-H-I-I-C-G-Cであった。

実施例 2

① 肝抽出液の調製

ラット(系統SD; 体重200~300g) 100匹の腹腔内にサラダ油に溶解した20%西塩化炭素溶液を10ml/kg投与し(西塩化炭素として2ml/kg投与)、30時間後に肝臓を抽出した。抽出した肝臓は0.15M NaCl、1mM PMSF、1mM モノヨード酢酸、1mM EDTAを含む緩衝液B(50mM Tris-HCl(pH 8.5)、10mM Hepes、2mM CaCl₂、0.01% Tween 80) 4ml中でワーリングブレンダーで破砕した。破砕後、冷却遠心機(日立 20PR-52)で10,000回転/分の遠心を行い、沈殿物を除いた。上澄を濾紙で濾過し、濾液を肝抽出液として得た。

② 陽イオン交換クロマトグラフィー

肝抽出液約4mlを約4倍容の0.15M NaClを含む緩衝液Bに2時間以上を3回透析した後、0.15M NaClを含む緩衝液Bで平衡化したS-セファロースFF(ファルマシア社製)のカラム(サイズ: 内

径11.3cm×高さ10cm)に添加した。

0.15M NaClを含む緩衝液で洗浄後、0.15M から1.0MのNaClの直線濃度勾配(全量6ml)により溶出した。溶出画分を参考例2に示した方法によりHGF活性を測定し、活性画分を集めS-セファロースFF溶出液とした。第6図にその溶出パターンを示す。

③ 色素アフィニティークロマトグラフィー

S-セファロースFF溶出液を1N HClでpH 7.5に調整後、同量の0.01% Tween 80を含む蒸留水で希釈し、緩衝液C(20mM Tris-HCl(pH 7.5)、0.01% Tween 80)で平衡化したBlue-Trisacryl M カラム(1B社製、カラムサイズ: 内径: 2.6cm×高さ13.5cm)に添加した。緩衝液Cで洗浄後、0から0.5Mのアルギニンの直線濃度勾配(全量350ml)により溶出した。溶出パターンを第7図に示す。

HGF活性の高い画分を集めBlue-Trisacryl M 溶出液とした。

④ ヘパリンアフィニティークロマトグラフィー

2 9

3 0

5.0% Tris-HCl) 抽出液を9.46gの緩衝液E (0.02M Tris-HCl (pH7.5)、0.01% Tween 80)で希釈した後、0.3M NaClを含む緩衝液Dで平衡化したヘパリンセファローブ C1-65カラム (ファルマシア社製、カラムサイズ: 内径1.6cm×高さ7cm) に添加した。0.3M NaClを含む緩衝液Dで洗浄後、0.3Mから2.0M NaClの直線濃度勾配 (全量150ml) により抽出した。抽出パターンを第8図に示す。HGF活性の高い画分を集めヘパリンセファローブ抽出液とした。

⑤疎水性クロマトグラフィー

溶媒A (20mM リン酸緩衝液 (pH7.5)、4M NaCl) と溶媒B (20mM リン酸緩衝液 (pH7.5)、50% エチレングリコール) の2:1混液により平衡化されたフェニル-5PWカラム (東ソー社製、カラムサイズ: 内径7.5mm×高さ7.5cm) にヘパリンセファローブ抽出液を添加した。抽出は溶媒AとBの組成比を2:1から0:1に連続的に変えることにより行った。その抽出パターンを第9図に示す。45分前後に抽出したHGF活性を示す画

分を集め精製HGF(1)を得た。尚、85分前後に抽出したHGF活性画分はHGF(2)であった。

⑥S-D-S-ポリアクリルアミド電気泳動

実施例1の⑤の項に示した方法に従い、本実施例の⑤項及び⑥項で得られたヘパリンセファローブ抽出液と精製HGF(1)のS-D-S-ポリアクリルアミド電気泳動を行った。結果を第10図に示す。

ヘパリンセファローブ抽出液は、非還元条件下で約80KDの単一バンドを示した。しかし、還元条件下では約80KD、約60KDと約32KDの3本のバンドを与え、2本鎖型HGF(1)と本鎖型HGF(2)の存在を示した。一方、精製HGF(1)は非還元条件下で同じく約80KDの単一バンドを、還元条件下で約60KD (α鎖) と約32KD (β鎖) の2本のバンドを示し、疎水性クロマトグラフィーによりHGF(1)が均一に単離されたことを示した。

⑦本実施例での②～⑤の精製工程の結果を下記第3表に示す。尚、本実施例でのHGF活性は参考例2に示したHGF活性測定法 (その2) に従っ

3 1

て行った。

第3表 肝抽出液からのHGF(1)精製工程

精製工程	サンプル量 (mg)	比HGF活性 (IU)	精製度	回収率 (%)
S-47pD-F	303	31,900	1	100
BuTe-Trisacryl M	33.4	22,100	6	69
AKVynpD-F	0.173	15,200	841	48
Phenyl-5PW	0.009	5,100	5480	16

⑧N末端アミノ酸配列の決定

本実施例の⑤で得られた精製HGF(1)のN端アミノ酸配列を、実施例1の⑤項に示した方法に従い、決定した。即ち、精製HGF(1)を還元アルキル化後、C₁₈逆相HPLCによりα鎖とβ鎖に分離し、ペプチドシーケンサーによりN端のアミノ酸配列を決定した。β鎖N末端の13個のアミノ酸配列はV-V-N-G-I-P-T-Q-T-T-V-Q-Wと決定され、血小板ホモジネート由来のHGF(1)アミノ酸配列と一致した。

3 3

3 2

実施例3

①ヒト胎盤抽出液の調製

ヒト胎盤 (1個約500gを5個) の皮をはぎとり、ナイフとハサミで組織を細かく切断したのち、10Lの緩衝液E (0.02M Tris-HCl (pH8.5)、0.1M NaCl、0.01% Tween 80) を加え、ワーリングブレンダーでホモゲナイズした。いったん低速遠心分離 (600g×5分間) により、大きな組織断片を除いた後、上清を再度高速遠心分離 (10,000g×20分間) にかけた。上清液をとり、沈まなかった粒子や脂肪をガーゼでこしとった後、緩衝液Eで平衡化しておいたD E A E-セファクリル (チッソ社製、湿重量200g) を加え、4℃にて1夜攪拌させた。樹脂を濾別し、緩衝液Eでくり返し十分洗浄し、水分を切った後、1.5MのNaClを含む緩衝液E1Eに投入し、約2時間攪拌して吸着物を樹脂より溶離させた。濾過して得た溶離液を緩衝液F (0.02M Tris-HCl (pH7.5)、0.3M NaCl、0.01% Tween 80) に対し、外液10倍量で3回透析し、胎盤抽出液を調製した。

3 4

②ヘパリンセファロースクロマトグラフィー

①項で得た胎盤抽出液を緩衝液Fで平衡化したヘパリンセファロース CL-6Bカラム（ファルマシア社製、カラムサイズ：直径 2.6cm×高さ 20cm）に流速 200ml/時間 でかけた。緩衝液Iにて非吸着物質を十分洗し出した後、0.3Mから2.0M NaClの直線濃度勾配溶出により、HGF活性物質を溶出させた。このヘパリンセファロースクロマトグラフィーの溶出パターンを第11区に示す。HGF活性は約1.0M NaCl付近に溶出され、その画分を第12区に示す。HGF活性を示す画分を集めてコンカナバリンAセファロースカラム溶出画分を得た。

③コンカナバリンAセファロースクロマトグラフィー

あらかじめ緩衝液C（0.02M Tris-HCl (pH 7.5)、0.5M NaCl、0.01% Tween 80）で平衡化させておいたコンカナバリンAセファロースカラム（ファルマシア社製、カラムサイズ：直径 1.6cm×高さ 5.0cm）にヘパリンセファロース溶出画分を添加した。緩衝液Cで洗浄後、0から0.5Mのメチル α -D-グルコシドを含む緩衝液Gにより、直線濃度勾配溶出を行った。流速は20ml/時間で行った。

3 5

性は45,000倍に上昇した。尚、本実施例でのHGF活性測定は参考例2に示したHGF活性測定法（その2）に従って行った。

④SDS-ポリアクリルアミド電気泳動

実施例1の②の項で述べた方法により、本実施例の②項及び③項で得られたコンカナバリンAセファロース溶出画分と精製HGF(1)画分のSDS-PAGEを行った。結果を第14区に示す。実施例1及び2と同様コンカナバリンAセファロース溶出画分には2本鎖型HGF(1)と1本鎖型HGF(2)が存在し、疎水性HPLCによりHGF(1)が均質に単離されたことが示された。

⑤N末端アミノ酸配列の決定

本実施例の④の項で得られた精製HGF(1)のN端アミノ酸配列を実施例1の⑤項に述べた方法と同じ方法により決定した。即ち、精製HGF(1)を還元アルキル化後、C₁₈逆相クロマトグラフィーにより分子量約50KDの α 鎖と約32KDの β 鎖とを分離し、ペプチドシーケンサーによりN端アミノ酸配列を決定した。 β 鎖N末端の18個のアミ

3 7

ノ酸配列が決定され、その配列は、V-V-N-G-I-P-T-R-T-N-I-G-W-M-V-S-L-R-Mであった。

⑥疎水性クロマトグラフィー

最終精製工程は疎水性クロマトグラフィーの1つであるフェニル 5PW HPLC（東ソー社製、カラムサイズ：直径0.75cm×高さ7.5cm）によって行った。溶媒C（0.02M リン酸緩衝液 (pH 7.5)、4M NaCl）と溶媒D（0.02M リン酸緩衝液 (pH 7.5)、50%エチレンジグリコール）の2:1混液でフェニル 5PWカラムを平衡化した後、コンカナバリンAセファロースカラム溶出画分を添加した。その後、溶媒CとDの組成比を2:1から0:1に連続的に変化させることにより溶出を行った。流速は0.5ml/分で行った。フェニル 5PW HPLCの溶出パターンを第13区に示す。保持時間45分前後に溶出したHGF活性画分を集めて精製HGF(1)画分を得た。

収量はヒト胎盤5個より約15 μ gの精製HGF(1)が得られた。全工程の収率は約20%で、比活

3 6

性は45,000倍に上昇した。尚、本実施例でのHGF活性測定は参考例2に示したHGF活性測定法（その2）に従って行った。

⑦発明の効果

本発明によれば、成熟肝実質細胞の生体外での増殖を可能とする二種のサブユニットからなる成熟肝実質細胞増殖因子(1)が提供される。

4. 図面の簡単な説明

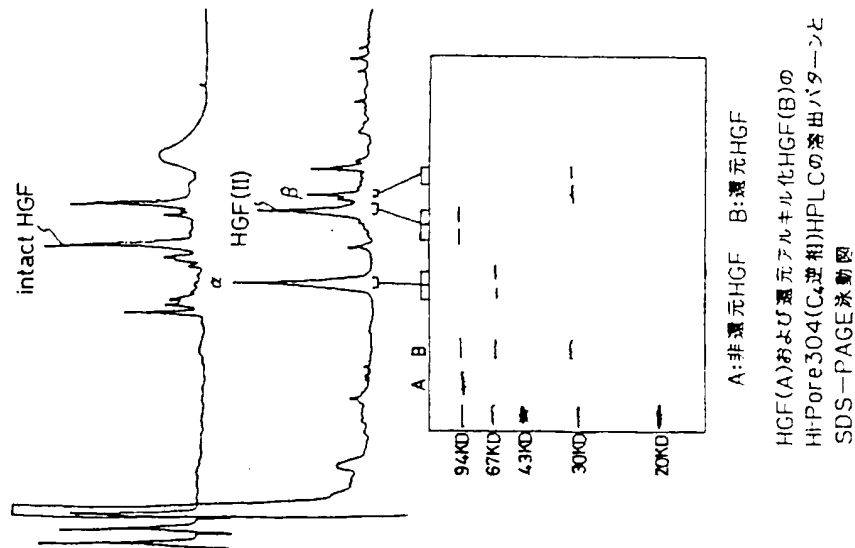
第1図は非還元HGF及び還元アルキル化HGFのHi-Pore 304（C₁₈、逆相）HPLCの溶出パターンとSDS-PAGE泳動区、第2図は塩析再溶解液のS-セファロースFF FPLCの溶出パターン、第3図はS-セファロースFF FPLC処理液のHGF(1)・L20抗体カラムの溶出パターン、第4図は精製HGF(1)のSDS-PAGE泳動区、第5図は還元アルキル化HGF(1)のHi-Pore 304（C₁₈、逆相）カラムの溶出パターン、第6図は肝抽出液のS-セファロースFFクロマトグラフィーの溶出パターン、第7図は肝抽出液の色素アフィニティークロマトグラフィーの溶出

3 8

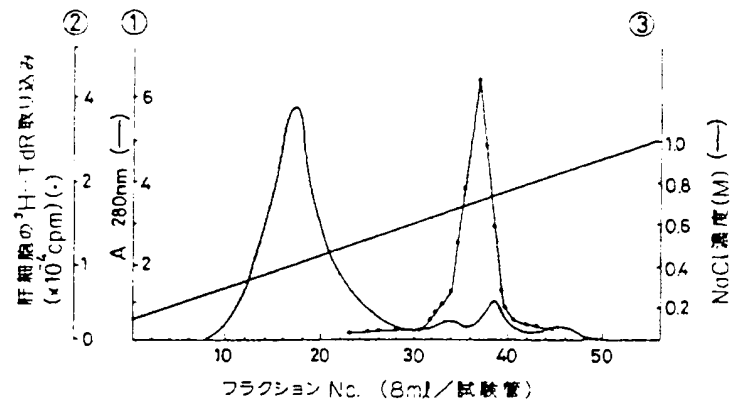
パターン、第8区は肝抽出液のヘパリン・セファロースクロマトグラフィーの溶出パターン、第9区は肝抽出液のフェニル・EPK HLBでの溶出パターン、第10区は肝抽出液から精製したHGFのSDS-PAGE、第11区は胎盤抽出液のヘパリン・セファロースクロマトグラフィーの溶出パターン、第12区は胎盤抽出液のコンカナバリンA・セファロースクロマトグラフィーの溶出パターン、第13区は胎盤抽出液のフェニル・EPK HLBでの溶出パターン及び第14区は胎盤抽出液から精製したHGFのSDS-PAGEの区である。

出願人 東洋紡績株式会社
代理人 弁理士 平 木 祐 輔
同 弁理士 石 井 貞 次

39

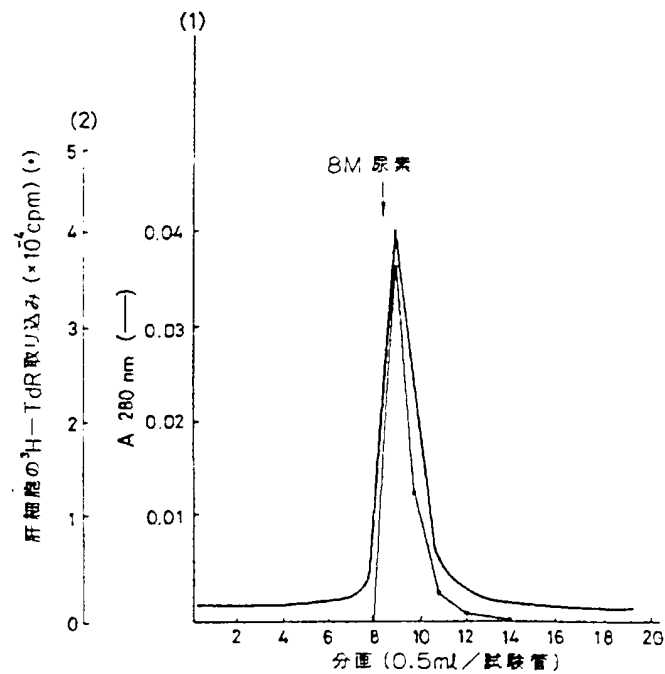


第 1 図



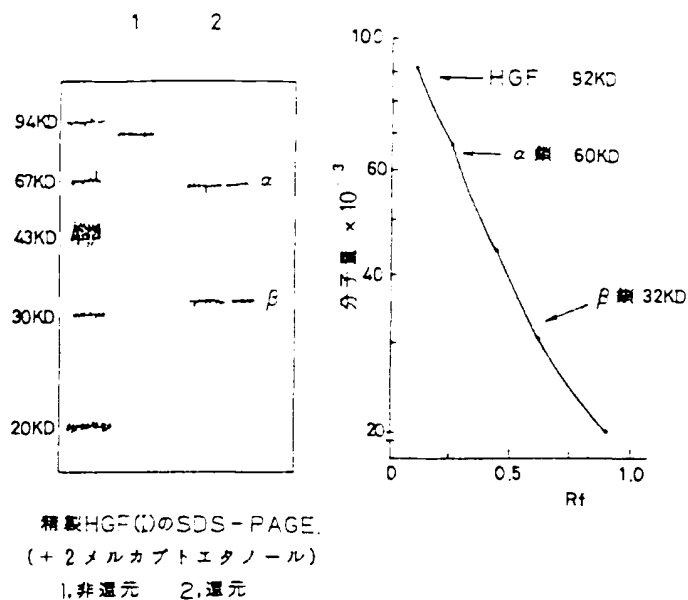
透析再溶解液のS-セファロース FF FPLCの溶出パターン

第 2 図

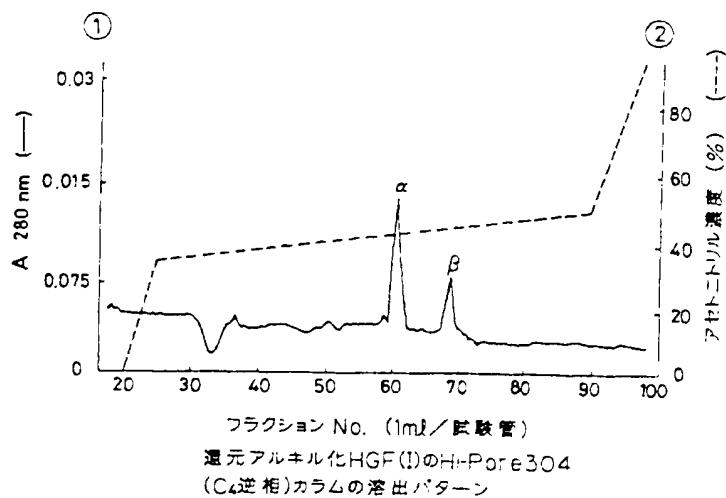


S-セファロースFF FPLC処理液のHGF(I)
L20抗体カラムの溶出パターン

第 3 図

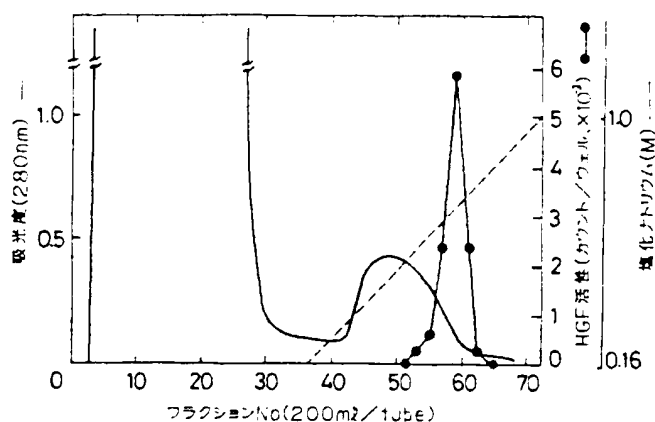


第 4 図



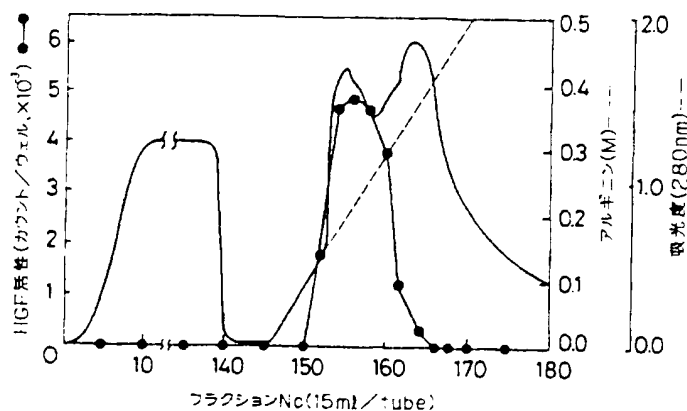
第 5 図

第 6 図



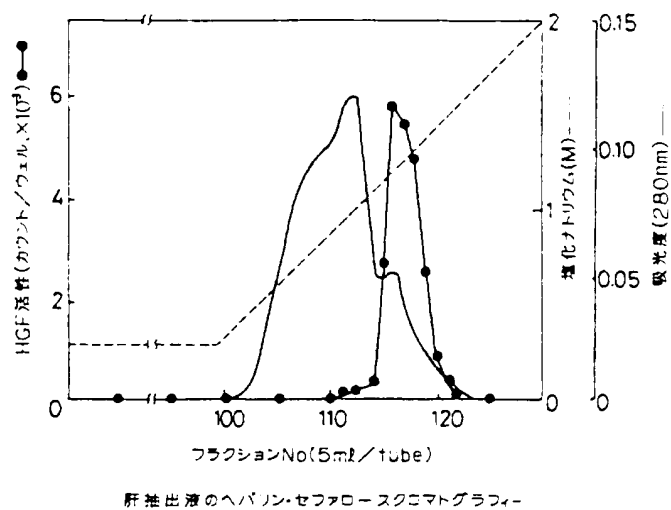
肝抽出液のS-セファロースFFクロマトグラフィー

第 7 図

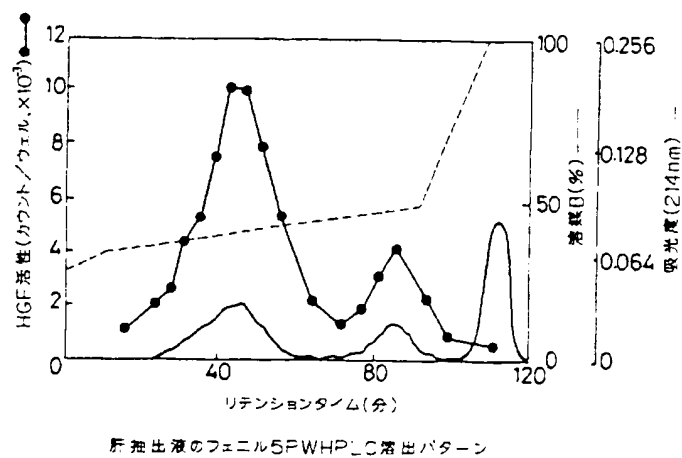


肝抽出液の色素アフィニティークロマトグラフィー

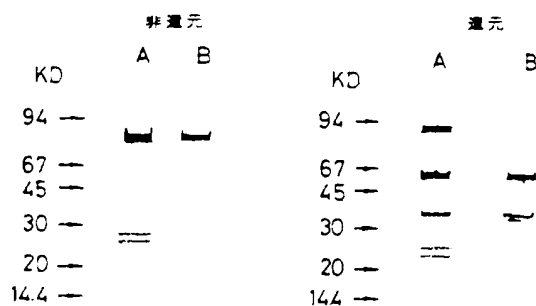
第 8 図



第 9 図



第 10 図

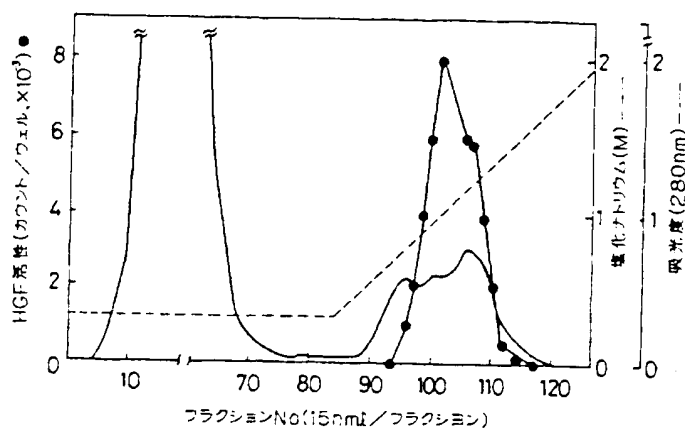


肝抽出液から精製したHGFのSDS-PAGE

A. ヘパリン・セファロース層出HGF画分

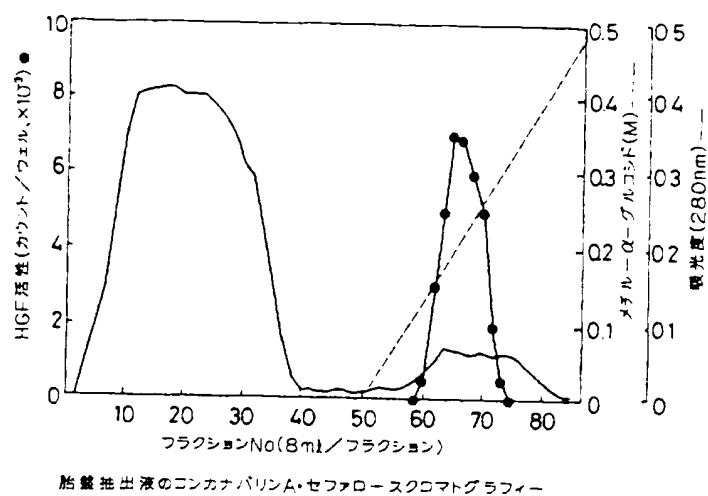
B. フェニル5PWHPLC精製HGF(I)

第 11 図

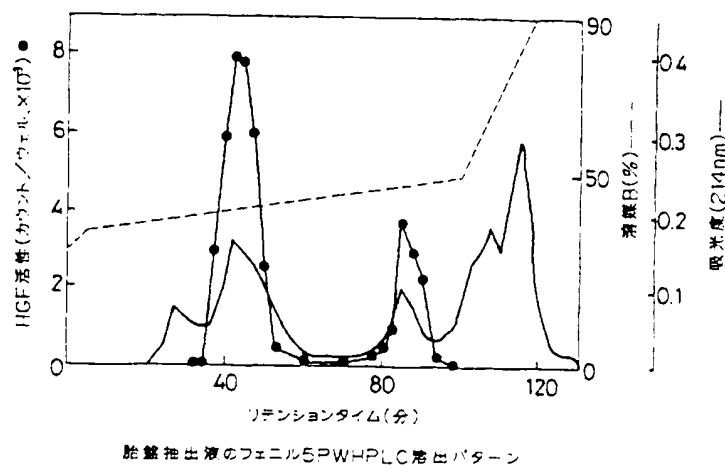


胎盤抽出液のヘパリン・セファロースクロマトグラフィー

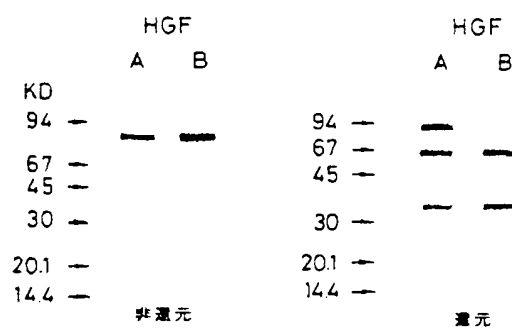
第 12 図



第 13 図



第 14 図



胎盤抽出液から精製したHGFのSDS-PAGE

A. コンカナバリンA・セファロース層出HGF画分

B. フェニル5PWHPLO精製HGF(i)